Lane Medical Library

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Ph. Brömser

Über die Abhängigkeit der tierischen Diastase von der Salz- und Wasserstoffionen-Konzentration

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der Zahnheilkunde

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Zwetana Zwetkowa
aus Plovdiv

München, im Oktober 1935

Bayerische Druckerei & Verlagsanstalt G.m.b.H., München, Müllerstraße 27

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154014_0132

Die Kenntnisse der diastatischen Wirkung des Pankreas wurden zuerst von (1) Bouchardat und Sandras entdeckt. Man konnte diese Wirkung sowohl im Sekret als auch in dem Infus der Drüse nachweisen.

Die älteste Methode zur Herstellung wirksamer Pankreasextrakte gehen auf (2) Kühne zurück, der Pankreassaft mit Alkohol ausfällte und einen Niederschlag, das „Pankreatin", erhielt. Der Niederschlag enthielt jedoch noch viele Beimengungen von Eiweißstoffen, die er unter dem Namen „Leukoid" zusammenfaßte und auch andere Verunreinigungen, von denen er das „Pankreatin" durch Auflösen in Wasser von 0°, folgender fraktionierter Fällung mit Essigsäure und Soda, schließlich durch Dialyse größtenteils befreien konnte. (3) Hammersten extrahierte das Pankreas mit 0,03%igem NH_3 und fällte mit Essigsäure. Der Niederschlag wurde dann in Sodalösung gelöst. (4) Loew extrahierte mit 40%igem Alkohol und fällte mit Alkohol-Aether.

Wirksamere Fermentlösungen, in denen sich allerdings auch die anderen Fermente des Pankreas befinden, sind von (5) Heidenhain durch Glyzerinextrakte, von (6) Roberts durch Chloroformwasser, Borsäure und Kochsalzlösung hergestellt worden.

Die ersten Versuche, ein rein diastatisches Ferment darzustellen, gehen auf (7) Danilewsky zurück. Leider ist seine Arbeit, die von großer Bedeutung war, eine große Reihe von Jahren unbeachtet geblieben. Er erstrebte eine Trennung der Pankreasfermente durch ein Adsorptionsverfahren. Aus einem lipatisch unwirksamen Pankreassaft wurde durch Adsorption mit Kollodium das eiweißspaltende Enzym frei von Diastase, aus dem Filtrat durch Ausfällen mit einem Teil von Eiweiß und Eluieren der Fällung durch verdünnten Alkohol, die Diastase allerdings noch trypsinhaltig erhalten.

(8) v. Wittich wollte mit wasserfreiem Glyzerin, das Trypsin nicht löst, nach vorheriger Behandlung mit Alkohol diastatischen Extrakt erhalten. Ebenso sind wirksame Auszüge von (9) P. Grützner, von (10) A. S. Loevenhart dargestellt worden. Man wußte nicht, ob die Fermente in den trüben Glyzerinauszügen suspendiert oder gelöst sind. Sie sind für die Reindarstellung der Enzyme ungeeignet, da sie auf Zusatz von Wasser reichliche Niederschläge liefern, wobei die ganze Menge Enzym mit gefällt wird.

Das Enzympräparat von (11) H. Pottevin war die mit Alkohol und Aether getrocknete Pankreasdrüse nach Zerreiben und

Sieben. Die wirksamsten, fermentreichsten Präparate sind von (12) Willstätter, Waldschmidt-Leitz, R. Hesse hergestellt worden. Als Ausgangsmaterial wurde das Pankreas des Schweines genommen, da schon nach Versuchen von (6) Roberts feststand, daß Schweinepankreas diastatisch am wirksamsten ist, Ochsen-, Schaf- und Hundepankreas dagegen diastatisch viel schwächer wirkt. Nach Willstätter wurden 16,5 kg frisch vom Schlachthof bezogene Drüsen möglichst gründlich von Fett usw. gereinigt. Die gereinigten Drüsen (14,9 kg) wurden im Wolf 4- bis 5mal zerkleinert, bis die Drüsenmasse dünnbreiig war. Dann wurde der Brei in Mengen von 3 kg in einer großen Reibschale mit mehr und mehr Azeton verrührt, mit dem Lösungsmittel in Flaschen übergespült und im ganzen mit 30 Liter Azeton in 5 Flaschen gut durchgeschüttelt, nach 1- bis 2stündigem Stehen abfiltriert, um den Filterrückstand von neuem durch Schütteln in den Flaschen und Filtrieren wie zuvor, mit 30 Liter Azeton, darauf 15 Liter Azeton + 15 Liter Aether und schließlich 2mal mit je 30 Liter Aether zu waschen. Das nun körnige und pulverige Material wurde zwischen den Fingern zerrieben, in einer dünnen Schicht auf Filtrierpapier ausgebreitet und an der Luft getrocknet. Man erhielt so 2,75 kg lufttrockenes, fettfreies, farbloses Pulver, das noch mit beträchtlichen Mengen von Fasersubstanz durchsetzt war. Zur Trennung von dieser wurde das Pulver in einer Schlagmühle aufs feinste gemahlen und durch ein feinmaschiges Sieb geschüttet. Mit dem Siebrückstand mußte das Mahlen und Sieben öfters wiederholt werden, solange bis das Sieb keine feinen Anteile mehr durchließ. Die Ausbeute bestand in 1,65 kg staubfreien Pulvers und 0,68 kg grobfaserigem Siebrückstand. Untersuchungen zeigten, daß auch das grobfaserige Material noch eine ansehnliche Menge feiner Drüsensubstanz enthält, aber es gelang nicht mehr, diese mit mechanischen Mitteln abzulösen.

Die weitere Behandlung des so erhaltenen Trockenpräparates durch Adsorptionsstoffe knüpft an Untersuchungen von (13) L. Michaelis und M. Ehrenreich an, die als erste der Entwicklung der Adsorptionsmethode einen neuen Auftrieb gaben. Sie wählten bei Untersuchungen über die „Adsorptionsanalyse der Fermente" solche Fälle der Adsorption aus, in denen die entgegengesetzte elektrische Ladung von Adsorbens und Adsorbendum maßgebend ist. Dabei wurde festgestellt, daß alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, alles Substanzen, die durch Tonerde adsorbiert werden können, Säuren sein müssen. Dadurch ließ sich die elektrochemische Natur der untersuchten Fermente mit Leichtigkeit ohne quantitative Bestimmungen nur auf Grund von Schätzungen feststellen.

Diastase wird unter allen Umständen von Kaolin und Tonerde adsorbiert, ist also amphoter. Invertin bei allen Reaktionen von

Tonerde, bei keiner von Kaolin adsorbiert, hat also den Charakter einer Säure usw.

Trypsin wird von Kaolin und Tonerde adsorbiert, bei neutraler und schwach saurer Reaktion vollkommen, ist amphoter.

Um die vorhandene Enzymmenge bzw. deren Wirksamkeit nach der weiter unten geschilderten Abtrennung der Diastase von dem Trypsin und der Lipase zu bestimmen, mußte erst eine brauchbare Methode zur quantitativen Bestimmung gefunden werden.

Von früheren quantitativen Methoden seien hier die Arbeiten von Lintner, (14) Pollak und (15) Wohlgemuth angeführt. Ersterer nimmt die reduzierende Kraft des entstehenden Zuckers aus gleichen Stärkemengen auf eine bestimmte Menge Fehling'scher Lösung zum Maßstab. Pollak mißt die Hydrolyse durch fortschreitende Aenderung des Dispersitätsgrades der Stärke bei enzymatischem Abbau und S. Wohlgemuth versucht durch das Verschwinden der blauen Jodreaktion einen bestimmten Abbauzustand zu ermitteln. Diese Methoden sind, da fast immer nur Schätzungen möglich sind, sicher ungenau. (16) Willstätter und G. Schudel geben bei vollständig maltasefreier Amylase eine neue Methode zur Zuckerbestimmung. Nach der Kupfermethode ist die Reduktionswirkung der reduzierenden Gruppen nicht streng proportional. Streng stöchiometrisch ist jedoch die Bestimmung der Aldehydzucker mittels Hypojodid. Außerdem gestattet sie ein schnelleres und genaueres Arbeiten.

Maltose (Merk)		n/10 H_2 verbraucht		berech.
20,2	20,2	1,11	1,05	1,12
40,4	40,4	2,14	2,16	2,24

Es sei hier allerdings eingeschaltet, daß die Verschiedenheit der Bestimmungsmethoden und andere Gründe wie chemisch nicht einheitliche Substrate und stufenweise verlaufende Reaktionen, ja bei allen sogenannten Fermentuntersuchungen immer wieder dieselbe störende Rolle spielen. Sie haben es oftmals dahin gebracht, daß bis heute über sehr viele Fragen keine Einigung zu erzielen war. Jeder neue Untersucher hat oft nur dazu beigetragen, die gewaltige Literatur zu vermehren, ohne eine definitive Lösung der Frage herbeizuführen, da immer wieder ein anderer kam, der seine Resultate bestritt.

Als Maße für die Menge und die Konzentration der Amylase schlagen Willstätter und Mitarbeiter folgende Einheiten vor:

Für die pankreatische Amylase wird als Maß die Amylaseeinheit, ähnlich der Lipaseeinheit, vorgeschlagen. Sie ist als das Hundertfache derjenigen Enzymmenge bestimmt, für die sich unter den angegebenen Versuchsbedingungen die Konstante der mono-

molekularen Reaktion gleich 0,01 ergibt. Daher drückt die Reaktionskonstante zugleich die Zahl von Amylaseeinheiten in der Analysenprobe aus. Wenn z. B. 0,5 mg Trockenpankreas in 10 Minuten 78,6 mg Maltose bildeten, so berechnet sich daraus K = 0,0236, und dies ist die Anzahl der Amylaseeinheiten in den angewandten 0,5 mg.

Die Menge von 0,01 Amylaseeinheiten vermag 25% der im Grenzabbau entstehenden Maltosemenge, nämlich 46,9 mg, in 12,49 Minuten zu bilden. Eine Amylaseeinheit finden wir als Gehalt von ungefähr 2 cg getrockneter Pankreasdrüse.

Den enzymatischen Reinheitsgrad eines Amylasepräparates soll den Amylasewert ausdrücken, nämlich die Zahl von Amylaseeinheiten in 1 cg der Substanz. Zu dem von (17) Euler und Svanberg für die Wirkungsfähigkeit von Malzamylase vorgeschlagenen Maße

$$Sf = \frac{K.g\ —\ Maltose}{g\ —\ Präparat}$$

steht der Amylasewert in einfacher Beziehung. Da das allgemeinere Maß von Euler usw., das sich auf 1 g des Enzympräparates bezieht, für verschiedene Konzentrationen des Substrates (im Gramm) anzuwenden ist, hat man Sf durch die festgesetzte Maltosemenge in Zentigramm zu dividieren, um zum Amylasewert zu gelangen.

$$\text{Amylasewert} = Sf\ 0{,}05333.$$

Isolierung der Pankreas-Amylase.

Das auf Seite 6 beschriebene Trockenpräparat diente als Ausgangsmaterial zur Isolierung der Amylase.

Der Amylasengehalt, der bei monatelangem Aufbewahren unverändert blieb, betrug in 1 cg 0,47 bis 0,48 Einheiten. Die Amylase ließ sich besonders leicht und vollständig in Lösung überführen, durch Wasser ebenso wie durch Glyzerin, leichter als die Lipase und viel leichter als das Trypsin. Diese Abstufung in der Lösbarkeit ist durch das ungleiche Adsorptionsverhalten der drei Enzyme bedingt. Das gepulverte Trockenpankreas wird mit wasserhaltigem Glyzerin (16 ccm für 1 g) unter wiederholtem Durchschütteln einige Stunden bei 30° behandelt; der mit der Zentrifuge abgetrennte, noch trübe Glyzerinauszug enthält 93 bis 98% der Amylase, und zwar in 100 ccm 284 bis 300 Amylaseeinheiten.

Den Rohextrakt klärt man durch Verdünnen mit dem fünffachen Volumen Wasser. Dabei fällt ein reichlicher Niederschlag aus, mit dem nur sehr wenig Amylase und Trypsin, aber etwas mehr, z. B. 15%, absorbierte Lipase verlorengeht.

Trennung von Lipase.

In den geklärten Glyzerinlösungen befinden sich neben der Amylase auch die Lipase, ¾ vom Gehalt der Drüse und das Trypsin, etwa der halbe Gehalt der Drüse. Eine aus 10 ccm Glyzerinauszug hergestellte, geklärte Enzymlösung enthielt nämlich 26,9 Am. E. und 36 L. E. und übte eine durch 1,47 ccm 0,8 normal KOH bestimmte tryptische Wirkung aus. Die Trennung gelingt mit Aluminiumhydroxyd auf Grund der stärker ausgeprägten Adsorptionsaffinität der Lipase. Während bei einmaliger Behandlung mit Aluminiumhydroxyd die Lipase aus der ausgesäuerten Lösung zu etwa 90% adsorbiert wird, bleiben Amylase und Trypsin zum großen Teil in der Mutterlauge zurück. Die Lipase muß aus der Amylaselösung mit Tonerde vollständig entfernt werden, wofür die Hälfte des für die Adsorption der Hauptmenge angewandten Aluminiumhydroxyds genügt (d. i. für 100 ccm rohe Glyzerinlösung 0,7 g Al_2O_3 für die zweite Adsorption). Es wäre nicht lohnend, den kleinen Anteil der Lipase, den diese zweite Adsorption entfernt, noch zusammen mit der Hauptmenge von Lipaseadsorbat zu verarbeiten. Von der Mutterlauge gaben dann z. B. 5,0 ccm keine meßbare Verseifung von Olivenöl in 60 Minuten. Diese Lipase-Restlösungen enthielten von der Amylase zwischen 70 bis 80%. In der von Lipase befreiten sauer reagierenden Lösung unterliegt die Amylase rascher Zersetzung. Diese läßt sich durch Zusatz von Glyzerin zu einem Gehalt von 50% oder durch Neutralisieren vermeiden. Versuche zeigten, daß die Amylasewirkung der neutralisierten Lösung mindestens eine Woche lang konstant bleibt. Auch lassen sich die verdünnten Lösungen bei neutraler Reaktion ohne Enzymverlust im Vakuum auf zehnfache Konzentration einengen.

Die eingedampfte Lösung der Amylase wird durch absol. Alkohol nur noch unvollständig und mit großem Verlust an enzymatischer Wirkung gefällt, z. B. fielen aus 20 ccm eingeengter Lösung von 65,1 Am. E. beim Vermischen mit dem Fünffachen an Alkohol 0,1062 g aus, die 11,0 Am. E enthielten, während in der Mutterlauge nur noch 15,8 Am. E. gefunden wurden.

Trennung von Trypsin.

Da bei der Ausscheidung der Lipase das diastatische und proteolytische Enzym das gleiche Verhalten gegen Tonerde zeigen, so bot die Anwendung verschiedener Sorten von Tonerde keine Aussicht für die Trennung von Amylase und Trypsin. Um so wichtiger war es, Unterschiede bei der Adsorption durch Kaolin aufzufinden. Die beobachteten Unterschiede waren nicht so durchgreifend, daß sie zu einer glatten Trennung der beiden Enzyme zu führen schienen. Amylase wurde bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion in geringem Maße adsorbiert, besser aus schwach essigsaurer

Lösung, am reichlichsten, wenn die Flüssigkeit zugleich einen beträchtlichen Alkoholgehalt besaß. Dagegen unterstützt der Zusatz von Alkohol nicht die Adsorption des Trypsins, das unter den verschiedenen Bedingungen zur Hälfte bis zu zwei Dritteln adsorbiert wird.

Das Adsorptionsverhalten der beiden Enzyme war in diesen Versuchen noch verschleiert. Bei der nochmaligen Einwirkung desselben Adsorbens gelang aber die Adsorption von Trypsin vollständig, ohne daß es wieder von einer nennenswerten Menge durch Amylase begleitet wurde. In der von Lipase befreiten Enzymlösung war also die Adsorbierbarkeit der Amylase nur durch ihre Begleiter bedingt. Sie führen in das Kaolin bei seiner ersten Anwendung einen Teil der Amylase mit. Dabei verarmt die Lösung an diesen für die Adsorption der Amylase unentbehrlichen Koadsorbentien, so daß die Amylase bei der zweiten Einwirkung von Kaolin nicht weiter adsorbierbar ist. Die Begleichstoffe haben zugleich die Adsorption des Trypsins gestört, das umgekehrt wie die Amylase erst bei der zweiten Behandlung mit Kaolin leicht und vollständig aufgenommen wird. Nach diesen Erfahrungen läßt sich die Trennung von Amylase und Trypsin durch zweimalige Einwirkung von Kaolin auf die schwach essigsaure (von Alkohol freie) Lösung durchführen, wobei sich die Verluste an Amylase gewöhnlich zwischen 20 und 40% bewegen.

Die Adsorptionsmethode hat demnach als Restlösung das diastatische Enzym trypsinfrei, als Elution aus dem Kaolin, das Trypsin frei von Amylase geliefert. Die Amylase befindet sich in der enzymatisch homogenen Lösung in über 12mal konzentrierterem Zustand als in dem geklärten Glyzerinauszug. Es läßt sich nun aber noch eine Steigerung des Reinheitsgrades der Amylase erreichen, weil die Amylase, wenn sie den Zustand enzymatischer Einheitlichkeit erreicht hat, noch immer ihren Begleitstoffen eine gewisse Adsorbierbarkeit verdankt. Sie wird auf dieser Stufe der Reinigung noch von Tonerde adsorbiert, und zwar aus neutraler Lösung bei einem hohen Gehalt an Alkohol. Ein Beispiel mag den eingeschlagenen Weg erläutern.

Nach Abtrennung von Lipase und Trypsin und Neutralisieren mit Lackmus bildeten von der Amylaselösung 0,0237 ccm in 10 Minuten 24,7 mg Maltose, entspricht K = 0,00614. 600 ccm dieser Lösung, die demnach 155,4 Am. E. enthielten, versetzte man mit 720 ccm 96% Alkohol und mit 360 ccm Suspension Tonerde (10,8 g Al_2O_3).

Die Adsorptionsrestlösung betrug 1435 ccm. Davon gaben 0,0566 ccm in 12,25 Minuten keine meßbaren Mengen an Maltose.

Das rasch in der Zentrifuge abgetrennte Adsorbat wurde unmittelbar in den Zentrifugengläsern zur Elution 2mal mit je 200 ccm ammoniakalischem Phosphat angerührt, das aus 114 ccm

1% $(NH_4)_2HPO_4$, 6 ccm n — NH_3 und 80 ccm 87% Glyzerin bestand. Von den vereinigten Elutionen, zusammen 435 ccm, bildeten 0,0142 ccm in 10 Minuten 24,2 mg Maltose, entspricht K = 0,0060. Diese Amylase ergibt also 187 Am. E. Es hat sich gezeigt, daß nicht eine Ueberaktivierung des Enzyms den zu hohen Wert verursachte, es bedarf weiterer Untersuchungen zur Erklärung dieser Steigerungen. Der erreichte Reinheitsgrad wird im folgenden gewiß nicht zu günstig, nur mit der Zahl der in der Ausgangslösung bestimmten 155,4 Am.E. berechnet. Von der Elution wurden 205 ccm durch 7tägige Dialyse gegen fließenden dest. H_2O von Elektrolyten und vom Glyzerin befreit. Beim Abdampfen hinterblieben 11,0 mg trockene Substanz. Der Amylasewert dieses mit Tonerde gereinigten Präparats ist demnach auf 64 zu schätzen.

Die enzymatische Konzentration der Amylase ist in dem beschriebenen Beispiel auf mehr als das 130fache von derjenigen in getrockneten Pankreas gesteigert. Für den Vergleich mit den Präparaten anderer Forscher verdankt man der Untersuchung von (17) H. Euler und V. Svanberg eine Brücke, das Maß Sf, nach welchem einem durch Dialyse gereinigten Präparate der Wert 16,6 zukam. Auch die hochwertigen Amylase-Präparate von (18) A. C. Sherman und E. C. Kendall lassen sich mit den nach Euler und Svanberg gemessenen Präparaten vergleichen. Die Malzamylase von A. C. Sherman hat nach Euler und Svanberg den Wert 58 Sf. Das von Willstätter beschriebene Präparat hat den Wert von mindestens 1305 Sf. erreicht. Nach der einmaligen Reinigung mit Tonerde zeigte das Präparat keine Reaktionen mehr von Proteinen und ihren Abbauprodukten. Mit 0.2% Lösung des Trockenrückstandes war Millon Reaktion negativ, die Ninhydrinprobe ergab bei längerem Kochen keine Färbung, Pikrinsäure und Ferrozyanwasserstoffsäure bewirkten keine Trübung. Nur die Reaktion von Molisch zeigte nach wie vor der Behandlung mit Tonerde einen geringen Gehalt von Kohlehydrat an.

Aktivierung und Hemmung der Amylase.

Einfluß von Elektrolyten.

Seit den Beobachtungen von (19) Nasse über den fördernden Einfluß von Salzen auf die diastische Wirkung des Speichels ist diese Abhängigkeit von Elektrolyten viel geprüft worden. Nach (15) Wohlgemuth ist dafür in erster Linie das betreffende Anion verantwortlich. Daß der Pankreassaft und künstliche Pankreasauszüge ihre diastische Wirksamkeit bei der Dialyse einbüßen und auf Salzzusatz wiedergewinnen, haben (20) H. Biery und J. Giaja beobachtet.

(21) H. Biery zog später die Malzamylase zum Vergleich heran und erkannte, daß die Abhängigkeit von der Salzgegenwart

einen wesentlichen Unterschied zwischen tierischer und pflanzlicher Amylase darstellt. Malzamylase wird durch Salze nicht aktiviert. Den Einfluß neutraler Alkalisalze auf die Wirkung der Speichel bzw. Malzamylase haben besonders (22) A. Hahn und K. Harpuder untersucht. Sie verwandten als Ausgangslösung 2 ccm Speichel in 500 ccm H_2O gelöst, der 14 Stunden dialysiert wurde, um eine möglichst salzfreie Diastaselösung zu bekommen. Als Stärke wurde lösliche Kahlbaumstärke in bestimmten Konzentrationen benützt und den Verlauf der Spaltungsreaktion verfolgte man nach der von (23) Michaelis und Pechstein modifizierten (15) Wohlgemuth-Methode. Neutrale Alkalisalze wirken auf Ptyalin, Malzdiastase und Pankreasdiastase in übereinstimmender Weise, sie fördern oder hemmen je nach der Konzentration des Salzes, des benützten Puffers und seiner Wasserstoffionen den Stärkeabbau. In Uebereinstimmung mit den Arbeiten von Michaelis und Pechstein konnte auch Hahn und Harpuder folgende Reihe für die fördernde Wirkung aufstellen: $Cl' / Br' / NO_3' / SO_4''$. Die geringste Wirkung übte also das SO_4'' aus. Als Grenzkonzentration, bei der der Einfluß der verschiedenen Alkalisalze noch als Aktivierung nachweisbar war, stellen folgende Werte dar:

$$Na\ Cl = {}^{n}/_{20000}$$
$$Na\ NO_3 = {}^{n}/_{5000}$$
$$\tfrac{1}{2}\ Na_2\ SO_4 = {}^{n}/_{5000}$$

Eine besonders auffällige Erscheinung konnte nach den Arbeiten von Hahn und Harpuder durch die Kombinationen der einfachen Alkalisalze hervorgebracht werden. Wenn z. B. das stärker fördernde Salz (Na Cl) mit dem schwächer wirkenden ($Na\ NO_3$) kombiniert wurde, so ist die Wirkung so, als ob das Na Cl allein zugegen wäre, oder die fördernde Wirkung ist etwas besser.

Sind beide Salze in gleicher Konzentration vorhanden, so macht sich fast nur der Einfluß des besser wirkenden bemerkbar, so daß der Abbau gleichschnell vor sich geht, als wenn das besser wirkende Salz allein benützt worden ist.

Kombiniert man ein schlecht wirkendes Salz in größerem Ueberschuß mit einem gut wirkenden in geringer Konzentration, so tritt der Einfluß des letzteren doch in Erscheinung, aber immerhin so, daß die volle Wirkung des Na Cl allein bei weitem nicht erreicht wird.

Bei der Speichel- und Malzdiastase ergab sich ferner, daß der Zusatz von neutralen Alkalisalzen zu Reaktionsgemischen, deren Wasserstoffzahl durch Puffer festgelegt war, die Wirkung gegenüber dem mit Puffer allein versetzten Ferment steigern oder vermindern kann, je nach der Konzentration des Puffers oder Salzes und je nach der Reaktion der Versuchslösung. Es konnte z. B. fest-

gestellt werden, daß bei der Anwendung von Na Cl bei der Reaktion $P^h = 7{,}83$ und der Salzkonzentration $^n/12{,}5$ n $^n/25$ eine Steigerung der Fermentwirkung sich ergibt. Die fördernde Wirkung des Salzzusatzes nimmt aber mit steigernder Pufferkonzentration deutlich ab. Der Salzzusatz fördert den Abbau bei der Reaktion $P^h = 7{,}83$, und zwar um so stärker, je geringer die Pufferkonzentration ist. Man erkennt ferner, daß man bei der Reaktion $P^h = 5{,}32$ es sowohl durch die Variation des Salzes bei konstanter Pufferkonzentration als auch durch die Aenderung der Pufferkonzentration bei konstanter Salzmenge in der Hand hat, hemmende Wirkung des Salzzusatzes in fördernde und umgekehrt überzuführen. So fördert z. B. der Zusatz von $^n/25$ Na Cl zu Puffer $^n/150$, während der Zusatz von $^n/12{,}5$ Na Cl zur gleichen Pufferkonzentration hemmt. Anderseits erzeugt Zufügen von $^n/25$ Na Cl zu $^n/75$-Puffer eine Hemmung gegenüber dem Puffer allein. Die gleiche Salzkonzentration zu $^n/150$-Puffer zugefügt hat dagegen deutlich fördernde Wirkung. Hemmt ein Salz bei gegebener Pufferkonzentration noch bei starker Verdünnung (z. B. $^n/100$), so ist auch durch weitere Herabsetzung seiner Konzentration Förderung nicht mehr zu erzielen.

Auch die Malzdiastase ergab ähnliche Verhältnisse. Für beide Fermente fanden also Hahn und Harpuder bei Reaktionen saurer als das Optimum eine günstigste Pufferkonzentration mit einem Abfall nach beiden Seiten, während bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration und auf der alkalischen Seite derselben Wirksamkeit des Puffers in den untersuchten Grenzen mit steigender Konzentration ständig zunimmt. Auch bei starker Verdünnung des Puffers, z. B. $^n/400$, macht sich eine Salzwirkung noch deutlich geltend. Sie wird auch dadurch bewiesen, daß der Umschlag von Förderung in Hemmung in der Salzpufferkombination mit konstantem Salzgehalt durch Veränderung der Pufferkonzentration auch in diesem Verdünnungsgebiet herbeigeführt werden kann.

Durch Gegenwart von Cl' kommen Höchstwerte zustande, die sich durch gleichzeitige Anwesenheit anderer Ionen, z. B. Azetationen, nicht mehr steigern lassen. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß in diesen Versuchen außer Cl' auch Phosphatpuffer zugegen sind, so daß sich Phosphationen, die nach (24) C. Kendall und H. Sherman ebenfalls aktivieren, schon neben Cl' geltend machen.

Nach neuesten Untersuchungen von (25) L. Ambard und S. Trautmann „Ueber die Rolle der H^+ und Cl' bei der Aktivierung der Amylase" ist die von der Stärke fixierte Menge der Amylase von der Konzentration der H^+ bzw. der Cl' unabhängig. Sie steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Zahl der Zusammenstöße der H^+ bzw. Cl'-Ionen mit dem Enzym. Der wahre Aktivator der Amylase ist demnach nicht allein das Cl', sondern das Ionenpaar H^+ und Cl'. (26) Cark und H. Edwards finden, daß die Wirkung von Salzen auf die Wirksamkeit der Amylase sehr

stark von ihrer Konzentration im Reaktionsgemisch abhängig ist. Cl' fördern die amyloklastische Wirkung stets, außer in sehr hohen Konzentrationen. Jodion hemmt ausgesprochen, auch in kleineren Konzentrationen. Die optimale Wirkung von K Cl liegt bei einer Konzentration von 0,0005%. Die Ionen SO_4'' und NO_3' zeigen geringe Wirkung. Auch organische Chlorverbindungen wie Aethylenchlorhydrin oder Glyzerinmonochlorhydrin wirken fördernd, und zwar scheint diese Wirkung auf der Abspaltung von Cl' zu beruhen.

In den Arbeiten von (23) Michaelis und H. Pechstein und (24) C. Kendall und Sherman ist indessen nicht streng zwischen dem Einfluß der Phosphationen und der sich zugleich geltend machenden Verschiebung der Wasserstoffzahl unterschieden worden. Die Arbeiten von (12) Willstätter und Mitarbeiter machen es wahrscheinlich, daß dem PO_4''' eine besondere aktivierende Wirkung zukommt. Stellt man nämlich dieselbe Wasserstoffzahl einmal mit Phosphat und das andere Mal mit Azetatgemisch ein, so erhält man gleich große Amylasewirkungen. Es sei dies an einem Versuch erläutert: 0,0032 ccm eines Glyzerinauszuges ließen sie 10 Minuten lang bei 37° auf 25 ccm 1% Stärke einwirken unter Zugabe von a) 10 ccm 0,1 normal Azetatpuffer von $P^h = 6{,}0$ (9,6 ccm 0,1 normal Na-Azetat + 0,5 ccm 0,1 n-Essigsäure) und b) 10 ccm 0,2 n-Phosphatpuffer von derselben Wasserstoffzahl (8,8 ccm 0,2 n - KH_2PO_4 + 1,2 ccm 0,2 n - Na_2HPO_4). Der gemessene Umsatz betrug dann a) 12,7; 12,3; 11,8; b) 11,8; 11,8; 12,5 mg Maltose. Für die Aktivierung durch Cl' ist ein Konzentrationsbereich von 0,003 bis 0,03 Normalität optimal. Darunter findet sie einen Zusatz von 1 ccm 0,2 n-Na Cl in der Bestimmungsprobe von 36 ccm, also 0,03% Na Cl-Konzentration, hinreichend für den Zweck der ausgleichenden Aktivierung. Die Befunde anderer Forscher weichen davon ein wenig ab, (21) H. Biery Na Cl-Gehalt 0,05, (15) Wohlgemuth für Speichelamylase 0,5% optimal). Gewiß weil ohne bestimmtes P^h und ohne Phosphatpuffer gearbeitet wurde. Zu anderen Ergebnissen kommen jedoch (27) A. Hahn und R. Michalik.

Um das Reaktionsoptimum der Pankreasdiastase zu erhalten, verfolgten sie den Abbau Kahlbaum'scher löslicher Stärke mit der Jodmethode. Bei der Pankreasdiastase ergab sich eine sehr starke Abhängigkeit des Reaktionsoptimums von der Natur des zur Festlegung der Wasserstoffzahl benützten Puffergemisches. Sie fanden das Reaktionsoptimum für Phosphatpuffer in Mittel bei $P^h = 7{,}10$, für Azetatpuffer bei $P^h = 5{,}50$. Wie bei der Diastase des Speichels liegt nach A. Hahn und Michalik die optimale Wasserstoffzahl bei Verwendung von Azetatpuffer weiter im Sauren als bei Verwendung von Phosphatpuffer. In den zur Feststellung des Optimums benützten Reaktionsgemischen war die Konzentration des Phosphatpuffers $^{mol}/_{75}$ auf Gesamtphosphorsäuregehalt berechnet, die des Azetatpuffers $^{n}/_{100}$ an Natriumazetat.

Bei den Untersuchungen über den Einfluß der neutralen Alkalisalze auf die Pankreasdiastasewirkung kommen sie zu folgenden Ergebnissen: Bei der Pankreasdiastase sind dieselben Regelmäßigkeiten festzustellen wie bei der Speicheldiastase. Auch hier ergeben in ihrer Wirkung Chloride, Sulfate und Nitrate die gleichen charakteristischen Unterschiede.

Im alkalischen Teil von Optimum aus gerechnet ($P^h = 8{,}18$) haben die Chloride stets fördernde Wirkung, die aber mit wachsender Pufferkonzentration abnimmt. Die Sulfate sind bei dieser Reaktion völlig wirkungslos. Die Nitrate fördern bei niederer, hemmen bei höherer Konzentration des Puffers.

Im sauren Teil von Optimum ($P^h = 5{,}99$) zeigen Chloride und Sulfate bei niederer Pufferkonzentration Förderung, die bei höherer Konzentration in Hemmung übergeht. Dabei tritt bei Sulfaten der Umschlag von Förderung in Hemmung schon bei viel niederer Pufferkonzentration ein als bei Chloriden. Die Nitrate hemmen bei dieser Wasserstoffzahl bei jeder Konzentration des Puffers, doch nimmt die Hemmung mit der Konzentration stark zu. Im Prinzip zeigt sich auch bei Pankreasdiastase wieder die gleiche Salzwirkung, die bis jetzt bei allen untersuchten Diastasen gefunden wurde, und die in einer Abnahme der Förderung resp. in einer Zunahme der Hemmung durch Salz mit wachsender Pufferkonzentration sich ausspricht.

Eine Verschiebung des Reaktionsoptimums durch den Zusatz von Salzen konnten Hahn und Michalik im Gegensatz zur Speicheldiastase bei Pankreasdiastase nicht feststellen.

Zu diesem Befunde ist jedoch eine neuere Arbeit von (31) A. Hahn und Hugo Meyer zu erwähnen, wo auch für die Pankreasdiastase eine Verschiebung des Reaktionsoptimums durch Salzzusatz gefunden werden konnte. Benützt man Azetatpuffer, so ist eine viel stärkere Verschiebung des Optimums nachweisbar als bei Benützung von Phosphatpuffer.

Nach (23) Michaelis und H. Pechstein liegt das Wirkungsoptimum der Pankreasamylase bei Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl $P^h = 6{,}1$ bis $6{,}2$ (Azetat + Phosphatpuffer), bei gleichzeitiger Aktivierung durch Cl' bei 6,7, durch Nitrat bei 6,9. Dieser Befund dürfte nicht mit der Annahme verschiedener Amylasearten zu deuten sein. Wie bei Pankreas-Lipase werden die Aktivatoren bei verschiedener Reaktion des Mediums ungleich wirken und ihr Einfluß wird den der Wasserstoffionenkonzentration überdecken. Die Versuche von Willstätter haben dies für den Na Cl-Zusatz bestätigt. Aehnlich haben (22) Hahn und Harpuder die Verschiebung des Optimums durch Salze als eine Folge der kombinierten Salz-Puffer-Aktivierung verstanden.

Für die Pankreasamylase liegen genaue Bestimmungen des Wirkungsoptimums vor von (28) H. C. Sherman, A. W. Tho-

mas und M. B. Baldwin. Die Messungen, die stets unter Zusatz von Na Cl mit Phosphatpuffer ausgeführt wurden, ergaben optimale Azidität zwischen $P^h = 6,7$ und 7,0.

Ohne Zusatz von Na Cl findet man die nämliche Reaktion von $P^h = 6,8$ optimal, wie die folgenden Zahlen zeigen:

Amylase bei wechselndem P^h ohne Chlorid.

0,0032 ccm Glyzerinauszug; 25 ccm 1% Stärke: 10 ccm 0,2 n - PO_4 - Puffer, 1 ccm H_2O, 37° 10 Min., Angaben in mg Maltose.

P^h =	5,4	6,0	6,8	7,5	8,0
	4,5	11,8; 12,5	18,8; 18,0	9,8; 10,2	4,3; 3,1

Auch bei Gegenwart der für größte Aktivierung gewählten Menge Na Cl, einer zweimal geringeren als in der Arbeit von Sherman usw., erscheint gemäß der folgenden Tabelle in Uebereinstimmung mit diesen Forschern der Wasserstoffexponent 6,8 optimal. Unter diesen Bedingungen ist die Abhängigkeit der Wirkung vom P^h verglichen mit den Angaben der amerikanischen Forscher stärker ausgeprägt.

Amylase bei wechselndem P^h (Phosphatpuffer) unter Chloridzusatz.

0,0016 Glyzerinauszug; 25 ccm 1% Stärke, 10 ccm 0,2 n Phosphatpuffer 1 ccm 0,2 n - Na Cl; 37° 60 Min. Angaben in mg Maltose.

P^h =	5,4	6,0	6,5	6,8	7,0	7,2	7,5	8,0
	32,3	40,9	59,3	73,4	69,5	64,2	59,2	39,6

Die Arbeit von (29) J. Temmink Groll über den Einfluß der Reaktion auf die Wirkung der Pankreasamylase führt gleichfalls zu denselben Ergebnissen. Während das Optimum der Speichelamylase bei Gegenwart von Chloriden bei $P^h = 6,7$ des Ptyalins bei Gegenwart von Nitraten bei 6,9 und bei Anwesenheit von Phosphaten, Sulfaten oder Azetaten bei 6,1 liegt, ergaben Versuche, daß Pankreasamylase am schnellsten bei $P^h = 6,8$ wirkt.

Wie schon oben erwähnt wurde, leiden sämtliche Arbeiten über Amylase und besonders die physiko-chemischen stark an den Unsicherheiten hinsichtlich der chemischen Natur und des Spaltungsverlaufes der Stärke und der Unmöglichkeit, zur Zeit vollständig einwandfreie Amylasepräparate herzustellen. Auch die optimale Wirkung der Diastase bei ganz bestimmten Wasserstoffzahlen wird neuerdings wieder in Frage gestellt durch eine Arbeit von (30) A. Oparin und J. Glasunow, die ich abschließend noch erwähnen möchte.

Der Niederschlag, der beim Mischen der Lösung von Nucleïnsäure und Eialbumin gebildet wird, ist imstande, Amylase zu inaktivieren, wenn er bei $P^h = 4,1$ und darunter in die Lösung des Fermentes eingetragen wird. Hierbei erfolgt Adsorption des Fer-

mentes durch den Niederschlag. Beim Erhöhen des P^h bis auf 4,7 wird die Amylase eluiert und vollständig reaktiviert. Diese Versuche zeigen, daß durch das „Nucleoalbumin" die Empfindlichkeit der Amylase gegenüber der aktuellen Azidität stark erhöht wird. Pepton setzt dagegen die Empfindlichkeit herab und ermöglicht es, die vollständige Aktivität der Amylase sogar bei verhältnismäßig starker Azidität ($P^h = 3{,}5$) aufrechtzuerhalten. Dies zeigt, wie stark die Abhängigkeit von P^h durch Begleitstoffe beeinflußt sein kann und wie wenig die P^h-Aktivitätskurve geeignet ist, das Ferment als solches zu kennzeichnen.

Herrn Prof. Dr. Hahn möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Ueberlassung des Themas, für das mir entgegengebrachte Interesse und erteilten Rat aufrichtig danken.

Literaturverzeichnis

1. Bouchardat und Sandras: C. R. XX 143, 1085 (1845).
2. Kühne: N. F. T. 194 (1876).
3. Hammerstein: Lehrbuch phys. Chem. 265 (1895).
4. Loew: Pflüg. Arch. **27,** 207 (1882).
5. Heidenhain: Pflüg. Arch. II 196.
6. Roberts: Proc. Roy. Soc. 26 (1880).
7. Danilewsky: Virch. Arch. **25,** 279 (1862).
8. v. Wittich: Pflüg. Arch. **12,** 285 (1876), II 196.
9. P. Grützner: Pflüg. Arch. **12,** 285 (1876).
10. A. S. Loevenhart: Americ. Chem. Soc. **24,** 491 (1900).
11. H. Pottevin: Bulb. Soc. chem. France **35,** 693 (1906).
12. Willstätter: Z. f. physikal. Chemie **125,** 132 (1923).

12a. Willstätter, Waldschmidt-Leitz, R. Hesse: Z. f. physikal. Chem. **126,** 143 (1923).

13. L. Michaelis u. M. Ehrenreich: Bioch. Z. **7,** 488 (1907) Bioch. Z. **12,** 285 (1908).
14. Pollak: Wochenschr. f. Brauerei, Bd. **20,** 595 (1903).
15. J. Wohlgemuth: Bioch. Z. **9,** 1 (1908).
16. Willstätter und G. Schudel: Chem. Ber. **51,** 780.
17. H. Euler und O. Svanberg: Z. physiol. Chem. **112,** 193 (1920).
18. A. C. S. Svanberg u. E. C. Kendall: Journ. Am. Soc. **37,** 643 (1915).
19. Nasse: Pflügers Arch. Bd. 9, S. 138.
20. H. Biery und J. Giaja: C. R. 143, 300 (1906).
21. H. Biery: Bioch. Z. **40,** 357 (1912).
22. A. Hahn und Harpuder: Z. Biol. **71,** 302 (1920).
23. Michaelis und H. Pechstein: Bioch. Z. **59,** 77 (1914).
24. C. Kendall und H. Sherman: Journ. Am. Soc. **32,** 1087 (1910).
25. L. Ambard und S. Trautmann: Bull. Soc. Chim. biol. **15,** 1272 (1933).
26. Cark und H. Edwards: Frans. Roy. Soc. Canada Leet III **28,** 107 (1934).
27. A. Hahn und R. Michalik: Z. Biol. **73,** 10 (1921).
28. H. C. Sherman, A. W. Thomas, Baldwin: Journ. Am. chem. Soc. **41,** S. 231 (1919).
29. J. Temmink Groll: Nederl. Tijdsch Genesk 62.
30. A. Oparin, Glasunow: Bioch. Z. **272,** 317 (1934).
31. A. Hahn, H. Meyer: Z. f. Biol. **74,** 227 (1922).

Lebenslauf

Ich, Zwetana Zwetkowa, wurde am 2. Juni 1910 als Tochter von Christo Zwetkoff in Plovdiv, Bulgarien, geboren. Vom Herbst 1917 bis Juli 1921 besuchte ich die Volksschule zu Plovdiv, von 1921 bis 1924 Mittelschule und von 1924 bis 1929 Realgymnasium. Dort bestand ich am 12. Juli 1929 die Reifeprüfung. Ich studierte vom Wintersemester 1931 Zahnmedizin in München. Im Sommersemester 1932 bestand ich das Latinum am Mädchengymnasium in Plovdiv, im Sommersemester 1933 in München die Zahnärztliche Vorprüfung und im Mai 1935 das Zahnärztliche Staatsexamen.